

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.49.018 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]
刘江凯, 宋雅芳, 刘友章, 杨谕晨, 张久梅. 虫草多糖体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为类肝细胞样细胞[J].
中国组织工程研究, 2012, 16(49):9221-9225.

虫草多糖体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为类肝细胞样细胞*☆

刘江凯¹, 宋雅芳², 刘友章², 杨谕晨², 张久梅²

文章亮点: 课题在中医药方法治疗肝病的基础上, 结合干细胞的研究进展, 选用冬虫夏草提取物虫草多糖在体外扩增并特异地诱导大鼠骨髓间充质干细胞向肝细胞样细胞分化, 旨在研究中药有效成分诱导骨髓间充质干细胞定向分化为肝细胞的体外环境, 发现其中起作用的中药有效单体成分; 并进一步研究中药有效成分诱导骨髓间充质干细胞定向分化为肝细胞的机制, 为探讨中医药方法与细胞移植相结合治疗急性肝衰竭、肝硬化等肝病提供实验基础。

关键词: 虫草多糖; 骨髓间充质干细胞; 分化; 肝细胞; 甲胎蛋白; 白蛋白; 角蛋白 18; 干细胞

摘要

背景: 如何促进骨髓间充质干细胞向肝细胞完全意义上的转化, 以便更有效改善病变肝组织的结构和功能将成为未来相关研究的重中之重。

目的: 探讨虫草多糖在体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为类肝细胞样细胞的可行性。

方法: 采用贴壁法培养 Wistar 大鼠骨髓间充质干细胞, 实验分 3 组对骨髓间充质干细胞进行诱导分化, 虫草组培养液中加入虫草多糖进行诱导, 终末质量浓度为 0.15 g/L; 阳性对照组培养液中加入肝细胞生长因子和表皮生长因子联合诱导, 质量浓度分别为 20 μg/L 和 10 μg/L; 空白对照组仅用含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液。

结果与结论: 分离纯化的骨髓间充质干细胞经流式细胞仪检测显示 CD34 阴性表达, CD44 阳性表达。诱导分化 7 d 时虫草组及阳性对照组细胞出现甲胎蛋白表达, 14 d 时表达增强, 28 d 时表达减弱, 阳性对照组甲胎蛋白阳性率高于虫草组; 诱导分化 7 d 时阳性对照组细胞角蛋白 18 出现表达, 14 d 时表达增强, 虫草组则在 14 d 时出现表达, 而后持续。诱导分化 7 d 时虫草组及阳性对照组白蛋白表达阴性, 14 d 时出现阳性。诱导分化 14 d 时虫草组及阳性对照组细胞糖原染色阳性, 28 d 时表达减弱。空白对照组结果皆为阴性。结果可见虫草多糖可以在体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为类肝细胞样细胞。

¹ 河南中医学院第一附属医院, 河南省郑州市 450008; ² 广州中医药大学第一附属医院, 广东省广州市 510405

刘江凯☆, 男, 1980 年生, 2009 年广州中医药大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事中医药防治慢性肝病的研究。
ljk1008@yahoocn

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2012)49-09221-05

收稿日期: 2012-03-05
修回日期: 2012-07-06
(20120305010/M · S)

Cordyceps polysaccharide induces differentiation of adult rat mesenchymal stem cells into a hepatocyte lineage *in vitro*

Liu Jiang-kai¹, Song Ya-fang², Liu You-zhang², Yang Yu-chen², Zhang Jiu-mei²

Abstract

BACKGROUND: How to promote the transformation of bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes to effectively improve the structure and function of diseased hepatic tissue will become a key part of future studies.

OBJECTIVE: To investigate the possibility of cordyceps polysaccharide inducing the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells *in vitro*.

METHODS: Wistar rat bone marrow mesenchymal stem cells were cultured by adherence method and then randomized to three groups. In the cordyceps polysaccharide group, bone marrow mesenchymal stem cells were induced with 0.15 g/L cordyceps polysaccharide. In the positive control group, hepatocyte growth factor (20 μg/L) and epidermal growth factor (10 μg/L) were added. In the blank control group, DMEM containing 10% fetal bovine serum was added.

RESULTS AND CONCLUSION: Flow cytometry showed that the isolated and purified bone marrow mesenchymal stem cells were negative for CD34 but positive for CD44. In the cordyceps polysaccharide and positive control group, α-fetoprotein expression appeared at 7 days, peaked at 14 days and was attenuated at 28 days. α-fetoprotein expression was higher in the positive control group than that in the cordyceps polysaccharide group at each time point. In the positive control group, cytokeratin 18 expression appeared at 7 days and was enhanced at 14 days. In the cordyceps polysaccharide group, cytokeratin 18 expression appeared at 14 days and continued thereafter. In the cordyceps polysaccharide and positive control groups, albumin expression was negative at 7 days, but it turned positive at 14 days. In the cordyceps polysaccharide and positive control groups, glycogen staining appeared positive at 14 days but it was attenuated at 28 days, and there was no positive glycogen staining throughout the experimental period

¹First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, Henan Province, China;
²First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Liu Jiang-kai^{*}, M.D., Attending physician, First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, Henan Province, China
ljk1008@yahoo.cn

Supported by: Science and Technology Program of Guangdong Province, No. 2010B030700068*

Received: 2012-03-05
Accepted: 2012-07-06

in the blank control group. These findings suggest that cordyceps polysaccharide can induce rat bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells.

Liu JK, Song YF, Liu YZ, Yang YC, Zhang JM. Cordyceps polysaccharide induces differentiation of adult rat mesenchymal stem cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(49):9221-9225.

0 引言

病毒性肝炎导致的重型肝炎或肝衰竭, 其死亡率高达50%–70%或更高, 目前尚缺乏广泛可行的有效治疗手段, 尽管肝移植可作为治疗肝衰竭和肝硬化失代偿期的有效手段, 但肝移植存在费用昂贵, 手术复杂, 移植后可能发生严重的排斥反应, 生存率不高等缺点, 尤其是供体肝缺乏, 使得这一治疗措施难以广泛推广。生物肝的替代疗法亦存在供肝细胞缺乏的问题, 因此, 如何修复坏死或纤维化的肝细胞, 改善患者的肝功能是肝病研究领域的一项重要课题。

现代医学研究表明骨髓间充质干细胞具有多向分化的潜能, 是一种理想的细胞治疗的干细胞来源。其向肝细胞分化的研究也有一定进展, 但存在肝细胞分化率低, 临床应用安全性和长效性还值得商榷。本课题在目前研究比较多的治疗肝病的中药有效成分中, 选用名贵中药单体冬虫夏草提取物虫草多糖特异性地诱导大鼠骨髓间充质干细胞向肝细胞样细胞分化, 旨在研究中药有效成分诱导骨髓间充质干细胞定向分化为肝细胞的体外环境, 发现其中起作用的中药有效单体成分, 为中医药方法与细胞移植相结合治疗急性肝衰竭、肝硬化等肝病提供理论基础。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外对比观察实验。

时间及地点: 实验于2009年3月至2010年12月在广州中医药大学第一附属医院实验中心完成。

材料:

实验动物: 成年雄性Wistar大鼠, 体质量180–200 g, 由南方医科大学动物实验中心提供。实验过程中对动物处置符合动物伦理学要求。

试剂:

试剂	来源
肝细胞生长因子, 表皮细胞生长因子	美国 PeproTech 公司
虫草多糖(40%纯度)	惠州东方植物保健科技公司
免疫组化试剂盒、兔抗大鼠 CD34、CD44	武汉博士德公司
大鼠白蛋白单克隆一抗、细胞角蛋白 18 多克隆一抗、甲胎蛋白单克隆一抗	美国 Santa cruz 公司
胎牛血清	以色列 BIOIND 公司
DMEM 培养液	杭州吉诺公司

实验方法:

骨髓间充质干细胞的培养、纯化: 断颈处死 Wistar 大鼠后, 放入体积分数为75%乙醇浸泡 15 min, 无菌条件下分离其胫骨和股骨, 去除表面附着组织, 用100%PBS反复冲洗, 将其两侧干骺端切除, 暴露骨髓腔, 含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液(含肝素100 U/mL)反复冲洗骨髓腔, 将骨髓冲至另一无菌平皿中, 用无菌吸管反复吹打成细胞悬液。将其移入无菌离心管, 1 000 r/min(离心半径16 cm), 离心 10 min, 弃上清及脂肪层, 收集沉淀物, 在细胞沉淀中加入含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液小心吹打成细胞悬液, 用细胞计数板计数, 以 $2 \times 10^{12} \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种。加完全培养液(含DMEM, $1 \times 10^5 \text{ U/L}$ 青霉素、 $1 \times 10^5 \text{ U/L}$ 链霉素, 体积分数为10%的胎牛血清)后接种于 25 cm²培养瓶中, 置于37 °C、体积分数为5%CO₂培养瓶中培养, 后每隔3 d换液, 待原代细胞增长至培养瓶的80%–90%融合时进行传代, 多次传代进行纯化。

骨髓间充质干细胞的鉴定: 取第3代长势良好的细胞, 用流式细胞仪检测细胞表面抗原CD34、CD44表达。

实验分组: ①虫草组: 培养液(含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液)中加入虫草多糖, 质量浓度为0.15 g/L。②阳性对照组: 培养液(含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液)中加入肝细胞生长因子及表皮细胞生长因子,

质量浓度分别为20 $\mu\text{g/L}$ 和10 $\mu\text{g/L}$ 。③空白对照组: 仅用含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液。虫草组和阳性对照组每24 h换液, 空白对照组每3 d换液。

免疫组化方法: 在培养的7, 14, 21, 28 d收集各组细胞, 消化细胞成细胞悬液, 制作成细胞爬片, 多聚甲醛固定15 min, 0.01 mmol/L PBS冲洗3 min \times 3次; 非免疫动物血清室温下封闭10 min, 甩弃多余封闭液, 勿洗, 加一抗: 细胞角蛋白18、白蛋白、甲胎蛋白皆用0.01 mmol/L PBS稀释(稀释比1:50), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 0.01 mmol/L PBS冲洗, 3 min \times 3次。加生物素标记的二抗, 室温下孵育20 min, 0.01 mmol/L PBS冲洗, 3 min \times 3次, 吹干。新配制的DAB显色5-10 min, 显微镜下监测其颜色变化, 自来水充分冲洗数次使显色终止, 苏木精复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。用0.01 mmol/L PBS代替一抗作为阴性对照, 镜下观察, 阳性标准为胞浆内出现棕黄色颗粒, 并对染色图像进行分析。

糖原染色检测细胞功能: 留取的细胞用Camoy固定液固定10 min, 蒸馏水冲洗数次, 待干。1%的过碘酸水溶液反应10 min, 蒸馏水冲洗数次, 待完全干燥。Schiff试剂反应30 min, 自来水充分冲洗, 常规脱水, 透明、中性树胶封固。

2 结果

2.1 形态观察和细胞鉴定 倒置显微镜下观察, 刚获得的细胞为比较均匀的球形, 接种24 h后部分细胞贴壁, 48 h时大部分细胞贴壁, 细胞形态逐渐多样, 为三角形、多角形或不规则形状, 部分成梭形。1周后细胞体积增大, 多见长梭形、多角形细胞。细胞增殖明显增快, 9 d左右铺满瓶壁, 传代后细胞形态多为梭形, 较前均匀, 部分多角形, 可见多核细胞, 增殖更快, 一般7 d可铺满瓶壁90%, 见图1。

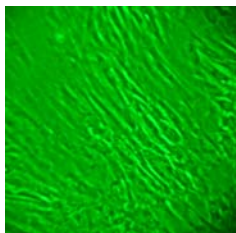


Figure 1 Passage 3 bone marrow mesenchymal stem cells exhibit a spindle-shaped appearance and are tightly spaced ($\times 10$)
图1 第3代骨髓间充质干细胞成类梭形生长, 排列紧密($\times 10$)

第4代细胞诱导后, 虫草组和阳性对照组前两周细

胞形态较前变化不大, 但增殖迅速, 特别是阳性对照组, 2周后可见部分细胞逐渐成类圆形或纺锤形, 胞核增大, 3周后可见部分细胞成圆形, 散在生长, 见图2。部分细胞仍为类梭形, 伸展生长。

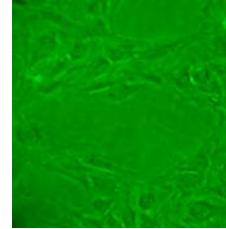


Figure 2 Some cells in the cordyceps polysaccharide group appeared round or oval after 28 days of induction ($\times 10$)
图2 诱导28 d 虫草组部分细胞成圆形或类圆形($\times 10$)

流式细胞仪检测第3代细胞表面抗原CD33阳性率为3.4%, CD44阳性率90.3%。

2.2 免疫组化检测结果 虫草组及阳性对照组诱导分化7 d时出现甲胎蛋白表达, 14 d时表达增强, 28 d时表达减弱, 阳性对照组的甲胎蛋白阳性率高于虫草组, 见图3, 4。

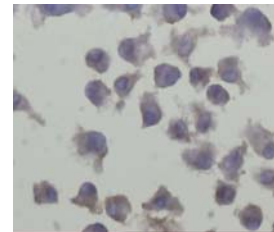


Figure 3 Cordyceps polysaccharide group image of α -fetoprotein positive staining shows cytoplasm as dark brown stained after 14 days of induction ($\times 400$)
图3 诱导14 d 虫草组甲胎蛋白阳性染色图像, 可见胞浆深染为棕褐色($\times 400$)

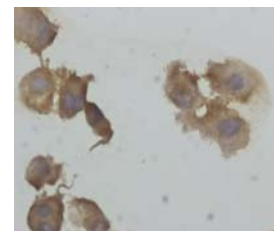


Figure 4 Positive control group image of α -fetoprotein positive staining after 14 days of induction ($\times 400$)
图4 诱导14 d 阳性对照组甲胎蛋白染色阳性图像($\times 400$)

阳性对照组诱导分化7 d出现角蛋白18表达, 14 d时表达增强, 虫草组则在诱导分化14 d时出现表达, 而后持续, 见图5, 6。虫草组及阳性对照组诱导分化7 d时白蛋白表达阴性, 14 d时出现阳性, 而后持续, 见图7, 8。空白对照组则皆为阴性。

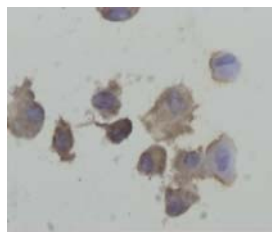


Figure 5 Cordyceps polysaccharide group image of cytokeratin 18 positive staining shows dark brown stained cytoplasm after 21 days of induction ($\times 400$)

图 5 诱导后 21 d 虫草组角蛋白 18 阳性染色图像, 可见胞浆深染为棕褐色($\times 400$)

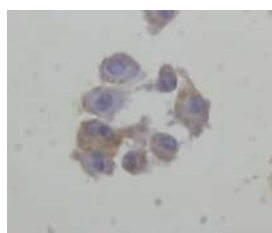


Figure 6 Positive control group image of cytokeratin 18 positive staining after 14 days of induction ($\times 400$)

图 6 诱导后 14 d 阳性对照组角蛋白 18 染色阳性图像($\times 400$)

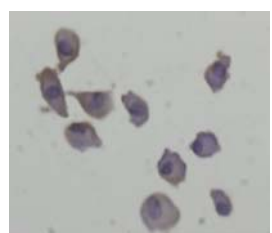


Figure 7 Cordyceps polysaccharide group image of albumin positive staining shows darkly stained cytoplasm after 14 days of induction ($\times 400$)

图 7 诱导 14 d 虫草组白蛋白染色阳性图像, 可见胞浆深染($\times 400$)

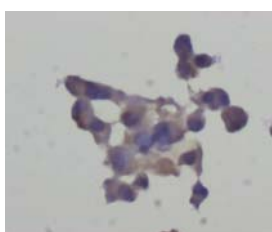


Figure 8 Positive control group image of albumin positive staining after 14 days of induction ($\times 400$)

图 8 诱导 14 d 阳性对照组白蛋白染色阳性图像($\times 400$)

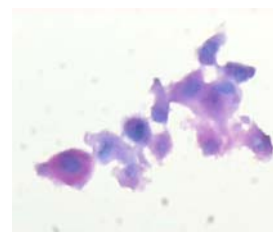


Figure 9 Cordyceps polysaccharide group image of glycogen staining shows darkly stained cytoplasm after 14 days of induction ($\times 400$)

图 9 诱导 14 d 虫草组糖原染色, 可见胞浆深染成鲜紫红色($\times 400$)

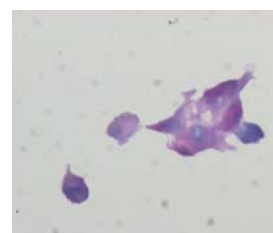


Figure 10 Positive control group image of glycogen staining shows darkly stained cytoplasm after 14 days of induction ($\times 400$)

图 10 诱导 14 d 阳性对照组糖原染色, 可见胞浆深染成鲜紫红色($\times 400$)

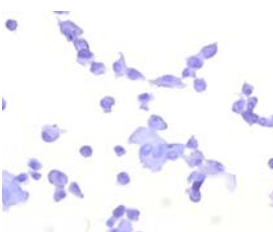


Figure 11 Blank control group image of glycogen staining shows slightly stained cytoplasm without dark brown substance ($\times 400$)

图 11 空白对照组糖原染色, 可见胞浆淡染, 未见棕褐色物质($\times 400$)

3 讨论

目前认为肝卵圆细胞为肝脏干细胞活化后的子代细胞, 具备向肝细胞及胆管上皮细胞分化的双向潜能^[1], 但由于其取材较困难, 也限制了其临床应用。而骨髓间充质干细胞来源广泛, 取材容易, 便于自体移植, 且在体外长期培养过程中, 骨髓间充质干细胞始终保持其多向分化的潜能, 遗传背景相当稳定, 体外基因转染率高, 并能稳定高效地表达外源基因, 故体内植入反应弱, 是一种理想的组织工程种子细胞。

冬虫夏草是中国一种名贵的中药材, 《本草从新》

2.3 糖原染色结果 虫草组及阳性对照组诱导分化 7 d 时糖原染色阴性, 14 d 时出现阳性结果, 28 d 时表达减弱, 见图 9, 10。空白对照组糖原染色见图 11。

中有“冬虫夏草甘平保肺，益肾，补精髓，止血化痰，已劳咳，治膈症皆良”。虫草多糖是从冬虫夏草提取的一种多糖，是冬虫夏草的主要活性成分，具有多种生理活性。现代研究发现虫草多糖对肝脏具有多重保护作用，如抗肝脏脂质过氧化作用，使肝匀浆丙二醛含量下降，超氧化物歧化酶活力升高；降低血清谷丙转氨酶活力和肝脾脏器指数，改善肝的坏死程度；提高血浆白蛋白，降低球蛋白；抑制总胶原及 I、II 型胶原在肝内沉积，并可使已形成的胶原重新溶解吸收；调节免疫，抑制病毒复制等作用^[2-4]，显示了其在肝病治疗中的巨大应用前景，本实验正是基于此，结合中医药治疗肝病的基础，选择虫草多糖对大鼠骨髓间充质干细胞进行体外诱导，国内外尚未见类似报道。

目前在诱导骨髓间充质干细胞分化为肝细胞的研究中，使用较多的是利用肝细胞生长因子及表皮细胞生长因子单独或联合进行诱导。肝细胞生长因子在肝脏发育及肝再生的过程中起重要作用，对多种细胞的有丝分裂、形态发生都具有刺激作用。表皮细胞生长因子具有促进上皮细胞代谢增殖的作用，能够刺激离子流动，加速能量转运，增加 DNA、RNA 以及蛋白质合成。部分研究已证实了两者的联合可体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为类肝细胞^[5-7]。

实验利用贴壁筛选法对大鼠骨髓间充质干细胞进行体外培养，扩增，经多次传代后用流式细胞仪检测细胞表面抗原 CD34、CD44，所得细胞表达 CD34⁻、CD44⁺，方法简单易行，易于操作。对诱导分化 7, 14, 21, 28 d 后的细胞用免疫组化法检测肝细胞的特异性标志甲胎蛋白、白蛋白、角蛋白 18 及糖原以确定诱导的细胞是否转化为肝细胞。甲胎蛋白和白蛋白都是一种胞浆蛋白，甲胎蛋白由幼稚肝细胞分泌，随着细胞的成熟而消失，成熟肝细胞则不表达。角蛋白 18 是肝细胞相对特异性的一种角蛋白，是成熟肝细胞的标志，在幼稚的肝前体细胞不表达，当肝细胞趋于成熟或已成熟时表达。糖原主要由肝实质细胞合成，存在于肝脏及肌肉组织中，是肝细胞功能表达标志之一。本课题用虫草多糖体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化，并用肝细胞生长因子及表皮细胞生长因子联合诱导作对照，两组在诱导 14 d 后，甲胎蛋白、白蛋白、角蛋白 18 及糖原染色皆出现阳性表达，充分说明虫草多糖在适当的培养环境中体外可诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为类肝细胞。而且由于中药的安全性和长期有效性，可以克服目前现代医学研究中

存在的某些困境，因此有可能与细胞移植治疗急性肝衰竭、肝硬化失代偿期的方法结合，带来广阔的应用前景。

4 参考文献

- [1] Oh SH, Hatch HM, Petersen BE. Hepatic oval 'stem' cell in liver regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2002;13(6):405-409.
- [2] Fang SY, Yao HW, Li J, et al. *Anhui Yike Daxue Xuebao.* 2004; 39(3):201-203.
方士英, 姚宏伟, 李俊, 等. 虫草多糖对小鼠化学性肝损伤的保护作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2004, 39(3):201-203.
- [3] Huang JM, Lu JH. *Shandong Zhongyiyao Daxue Xuebao.* 2010; 34(3):258-259.
黄军民, 卢建华. 虫草多糖对肝损伤模型小鼠肝细胞外基质表达的影响[J]. *山东中医药大学学报*, 2010, 34(3):258-259.
- [4] Zheng XL, Li YG, Zhong S, et al. *Zhejiang Nongye Kexue.* 2011 (3):702-705.
郑贤林, 李有贵, 钟石, 等. 蚕蛹虫草多糖对氢化可的松致小鼠肝损伤的保护作用[J]. *浙江农业科学*, 2011(3):702-705.
- [5] Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, et al. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;279(2):500-504.
- [6] Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, et al. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;288(1):156-164.
- [7] He ZJ, Fang CH, Ma JX, et al. *Jiefangjun Yixue Zazhi.* 2006; 31(5):446-449.
何忠杰, 方驰华, 马俊勋, 等. 肝细胞生长因子与表皮细胞生长因子联合诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为类肝细胞[J]. *解放军医学杂志*, 2006, 31(5):446-449.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 广东省科技计划项目 (2010B030700068)。

作者贡献: 实验设计为刘友章、刘江凯，实验实施为刘江凯、宋雅芳、杨渝晨、张久梅，实验评估为刘江凯，资料收集为刘江凯、宋雅芳，刘江凯成文，刘友章审校，刘江凯对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明: 文章为原创作品，数据准确，内容不涉及泄密，无一稿两投，无抄袭，无内容剽窃，无作者署名争议，无与他人课题以及专利技术的争执，内容真实，文责自负。